



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CONTENDO  
LACASE, HALOISITA E SURFACTANTE PARA  
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA**

**NÍCOLAS OLIVEIRA DECARLI**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> IOLANDA CRUZ VIEIRA**

**Prof. Dr. EDUARDO ZAPP**

Florianópolis  
Novembro/2015

Nícolas Oliveira Decarli

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CONTENDO LACASE, HALOISITA  
E SURFACTANTE PARA DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA**

Relatório apresentado ao Departamento  
de Química da Universidade Federal de  
Santa Catarina, como requisito parcial da  
disciplina de Estágio Supervisionado II  
(QMC 5512).

Florianópolis  
Novembro/2015

Nícolas Oliveira Decarli

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR CONTENDO  
LACASE, HALOISITA E SURFACTANTE PARA  
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA**

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize  
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iolanda Cruz Vieira

---

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Zapp

---

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

---

Dr<sup>a</sup>. Daniela Mezalira

Florianópolis  
Novembro/2015

## Sumário

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                  | 7  |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....                                       | 8  |
| 2.1. Biossensor.....                                                 | 8  |
| 2.2. Lacase .....                                                    | 8  |
| 2.3. Surfactantes.....                                               | 10 |
| 2.4. Dopamina .....                                                  | 11 |
| 2.5. Voltametria .....                                               | 11 |
| 3. OBJETIVO GERAL .....                                              | 14 |
| 3.1. Objetivos específicos.....                                      | 14 |
| 4. METODOLOGIA.....                                                  | 15 |
| 4.1. Reagentes e soluções.....                                       | 15 |
| 4.2. Equipamentos.....                                               | 15 |
| 4.3. Determinação da atividade da lacase e imobilização em HNT ..... | 16 |
| 4.4. Construção do biossensor .....                                  | 16 |
| 4.5. Escolha do melhor surfactante .....                             | 17 |
| 4.6. Preparo das amostras e determinação de dopamina .....           | 17 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                      | 18 |
| 5.1. Princípio de funcionamento do biossensor .....                  | 18 |
| 5.2. Escolha do surfactante.....                                     | 19 |
| 5.3. Estudo da quantidade de enzima empregada no biossensor.....     | 20 |
| 5.4. Influência dos modificadores no biossensor .....                | 21 |
| 5.5. Otimização do pH e da natureza do eletrólito de suporte .....   | 22 |
| 5.6. Otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas .....      | 24 |
| 5.7. Curva de calibração para dopamina .....                         | 24 |
| 5.8. Estudo de Interferentes.....                                    | 25 |
| 5.9. Estudo de Recuperação .....                                     | 26 |
| 5.10. Estudo de reprodutibilidade e repetibilidade .....             | 27 |
| 5.11. Determinação de dopamina em fármaco.....                       | 27 |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                   | 30 |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                                 | 31 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação da enzima lacase na oxidação de compostos fenólicos.....                                                   | 9  |
| <b>FIGURA 2.</b> Estrutura molecular da dopamina.....                                                                                                                      | 11 |
| <b>FIGURA 3.</b> Voltamogramas representativos das técnicas de pulso diferencial (A); E de onda quadrada para um processo reversível (B).....                              | 12 |
| <b>FIGURA 4.</b> Princípio do funcionamento do biossensor contendo a enzima lacase imobilizada em HNT e o surfactante ImS3-14 empregado na determinação da dopamina.....   | 17 |
| <b>FIGURA 5.</b> Estrutura dos surfactantes estudados por espectroscopia de impedância eletroquímica.....                                                                  | 18 |
| <b>FIGURA 6.</b> Gráfico do estudo da espectroscopia de impedância eletroquímica para os eletrodos contendo: ImS3-10, ImS3-12, ImS3-14 e ImS3-16.....                      | 19 |
| <b>FIGURA 7.</b> Gráfico do estudo da influência de cada modificador para o melhor funcionamento do biossensor.....                                                        | 21 |
| <b>FIGURA 8.</b> (A) Estudo de pH e da natureza do eletrolito de suporte. (B) 1) Equação de equilíbrio de oxirredução da dopamina; 2) Equação de Nernst.....               | 22 |
| <b>FIGURA 9.</b> Voltamogramas de VOQ e VPD com a inserção das respectivas curvas de calibração, realizados em solução tampão fosfato (0,1 mol L <sup>-1</sup> ) pH 7..... | 24 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 1.</b> Parâmetros das técnicas de VPD e VOQ.....                | 23 |
| <b>TABELA 2.</b> Possíveis interferentes para a detecção de dopamina..... | 25 |
| <b>TABELA 3.</b> Estudo de recuperação .....                              | 26 |
| <b>TABELA 4.</b> Determinação de dopamina em amostras farmacêuticas.....  | 27 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**VPD** – Voltametria de Pulso Diferencial  
**VOQ** – Voltametria de Onda Quadrada  
**VL** – Voltametria Linear  
**VC** – Voltametria Cíclica  
**EPC** – Eletrodo de Pasta de Carbono  
**HNT** – Nanotubos de Halosita

## RESUMO

A lacase é uma enzima da classe das oxirredutases e atua na catalise dos processos de oxidação de compostos fenólicos. Quando utilizada em biossensores utiliza-se a técnica de imobilização enzimática para proporcionar uma adequada estabilidade e maior tempo de vida útil do biossensor. Desta forma diferentes materiais têm sido explorados com essa finalidade, como por exemplo, os nanotubos de haloisita (HNT). Outra classe de materiais que também tem sido empregada no desenvolvimento de sensores é a dos surfactantes, que são moléculas que contribuem para o aumento da sensibilidade destes dispositivos através de um mecanismo de adsorção do analito. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor à base de pasta de carbono contendo a enzima lacase imobilizada em HNT juntamente com o surfactante 3-(1-tetradecil-3-imidazólio) propanosulfonato (ImS3-14) para detecção eletroquímica de dopamina. A dopamina é um neurotransmissor pertencente à classe das catecolaminas, e tem seu nível no corpo humano associado ao mal de Parkinson e a esquizofrenia. Foram avaliados diferentes surfactantes onde a partir do estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica foi escolhido o ImS3-14. O Estudo da quantidade de enzima utilizada na construção do biossensor mostrou que o ideal foi de  $0,05 \text{ U mL}^{-1}$ . Diferentes modificadores foram avaliados e o que apresentou melhor resultado foi selecionado. Foi investigada a influência do pH para determinação da dopamina utilizando o biossensor proposto, estudo que apresentou a solução tampão fosfato pH 7 como melhor eletrólito de suporte. Além destes estudos foram realizados testes para avaliar a exatidão (estudo de recuperação) e a precisão (estudo de repetibilidade e reprodutibilidade). Por fim foi realizada a determinação de dopamina em fármacos. Os resultados obtidos com o biossensor proposto foram superiores aos obtidos com os eletrodos não modificados e parcialmente modificados, mostrando a eficiência da modificação do eletrodo com a lacase imobilizada em HNT em sinergismo ao uso do surfactante.

## 1.INTRODUÇÃO

Métodos eletroanalíticos são bastante utilizados para a determinação de diferentes analitos devido ao baixo custo das análises e da instrumentação comparadas a outras técnicas analíticas. Por essas vantagens são cada vez mais estudadas maneiras de como aumentar a sensibilidade e a seletividade desses métodos. A forma mais utilizada para conferir essas qualidades é a adição de modificadores aos eletrodos de trabalho.

Dentre os eletrodos mais empregados destaca-se o eletrodo de pasta de carbono (EPC) por apresentar vantagens em relação à facilidade da sua confecção, baixo custo, possibilidade de renovação da superfície e baixa corrente residual. Entre as modificações mais empregadas neste tipo de eletrodo estão a adição de polímeros, nanomateriais, anticorpos, DNA, enzimas, entre outros. Quando o modificador empregado na construção do EPC for uma enzima o eletrodo passa a ser denominado de biossensor enzimático.

Enzimas são modificadores muito importantes, pois além de serem biocatalisadores muito eficientes, conferem ao eletrodo uma maior seletividade, devido à especificidade de seu sítio ativo. Neste trabalho, foi utilizada a lacase, uma enzima que catalisa processos de oxidação de compostos fenólicos como, por exemplo, a dopamina. A dopamina atua como neurotransmissor no corpo humano e os seus níveis anormais estão ligados a transtornos psicológicos e doenças do sistema nervoso. Por esse motivo é de fundamental importância a sua determinação.

Outros modificadores utilizados em eletrodos são os surfactantes. Essas moléculas apresentam na mesma estrutura molecular uma parte polar (“cabeça”) e uma parte apolar (“cauda”) e quando adicionadas ao eletrodo conferem novas propriedades interfaciais facilitando o acesso do analito a sua superfície onde vão ocorrer os processos de transferência eletrônica.

Demonstrada a importância da modificação do EPC, neste trabalho após construção e otimização o mesmo foi empregado na determinação de dopamina visando uma alta seletividade e uma boa sensibilidade utilizando técnicas voltamétricas como voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VQO).

## **2.REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Biossensor**

Biossensor é um dispositivo composto por um material biológico associado a um transdutor que é capaz de fornecer informação analítica quantitativa de um analito. O material biológico é o elemento de reconhecimento, um receptor biológico que ao interagir com um analito específico resulta em alguma transformação das propriedades físico-químicas deste analito. Essa transformação pode gerar uma luminescência ou uma transferência de elétrons ou uma variação na massa ou gerar uma radiação eletromagnética. Como este receptor está em contato direto com o transdutor este deve ser coerente com a propriedade físico-química que estará variando, no caso do presente trabalho o transdutor será um transdutor eletroquímico, mais especificamente, do tipo amperiométrico. Esse transdutor será utilizado porque a resposta obtida será na forma de corrente por isso utilizamos este transdutor.<sup>1,2</sup>

A adição de enzimas como modificador em eletrodos contribui para que estes tenham uma maior seletividade e sensibilidade. Estas são características importantes para medidas eletroquímicas já que muitas moléculas podem interferir nas análises ocasionando erros na determinação da concentração do analito por possuírem potenciais de redução/oxidação próximos dos potenciais do analito. Alguns modificadores como, por exemplo, enzimas, surfactantes e nanomateriais podem conferir essas qualidades ao eletrodo.<sup>3-5</sup>

### **2.2. Lacase**

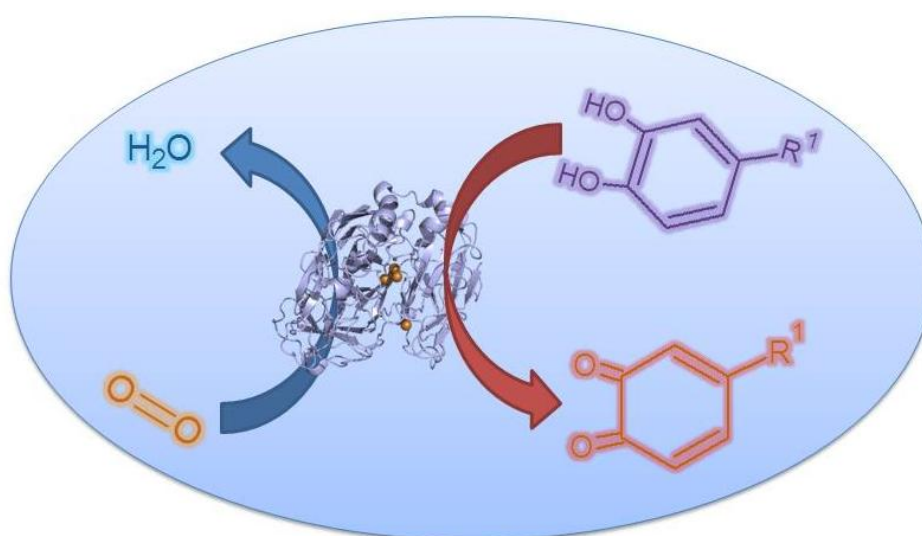
As lacases são enzimas que contém átomos de cobre em seu sítio ativo, e são muito encontradas na natureza, especialmente em fungos e plantas. É uma enzima da classe das oxidases, que na presença de oxigênio molecular catalisa reações de oxidação de compostos fenólicos em suas respectivas quinonas, ao mesmo tempo em que reduz o oxigênio a água.<sup>6,7</sup> A Figura 1 demonstra uma representação esquemática da atuação da enzima na oxidação de compostos fenólicos, como pode ser observado. A enzima contribui para um



aumento na velocidade da reação de oxidação do composto fenólico possibilitando uma maior quantidade de moléculas oxidadas na superfície do biossensor e assim uma maior corrente resultante deste processo.

A lacase é muito estudada e possui vasta aplicação tecnológica. Alguns exemplos são a biotransformação de efluentes industriais, descoloração de corantes, clarificação de vinhos e chás, e em eletroquímica como modificador de biossensores.<sup>8</sup>

**Figura 1.** Representação esquemática do mecanismo de ação da enzima lacase na oxidação de compostos fenólicos.



Devido a grande sensibilidade das enzimas a mudanças de temperatura e do pH é muito importante realizar a imobilização da enzima evitando que a enzima desnature e perca seu poder catalítico. Para isso existem muitos tipos de imobilização (encapsulação, adsorção, reticulação), porém o que será abordado neste trabalho é o de adsorção principalmente pela sua simplicidade. A adsorção pode ser separada em dois grupos, adsorção física e química.<sup>9,10</sup>

A adsorção química envolve a ligação covalente entre a enzima e o material usado como suporte dando uma maior rigidez e estabilidade. Porém esta rigidez pode afetar o poder catalítico da enzima, pois esta terá uma menor liberdade conformacional podendo assim não preservar o sítio catalítico da enzima. Já a adsorção física ocorre por interações do tipo *van der Waals*, uma interação bem mais fraca, mas que também aumenta a estabilidade da enzima

além de deixar a enzima mais livre que o anterior, afetando menos o seu sítio ativo.<sup>11,12</sup>

Muitos materiais vêm sendo utilizados como suporte para a imobilização da enzima por adsorção física, como, por exemplo, polímeros e nanomateriais. Desta maneira a haloisita em escala nanométrica (nanotubos de haloisita, HNT) apresenta elevada capacidade adsorvente (devido à alta área superficial desse nanomaterial) podendo ser empregada como suporte na imobilização de biomateriais.<sup>13</sup>

### **2.3. Surfactantes**

Os surfactantes são moléculas que possuem em sua estrutura uma “cabeça” polar e uma “cauda” apolar e por isso busca em um sistema uma interface onde podem estar em contato direto com as duas fases (polar e apolar). Por apresentarem esta característica anfifílica esse tipo de molécula confere novas propriedades interfaciais ao sistema em que estão presentes. Por exemplo, quando adicionadas à água, diminuem a tensão superficial deste líquido pois se distribuem primeiramente por toda a superfície, água/ar, onde ficam com a “cabeça” voltada para água e a “cauda” voltada para o ar diminuindo assim a tensão criada pela exposição direta de moléculas de água ao ar.<sup>14</sup>

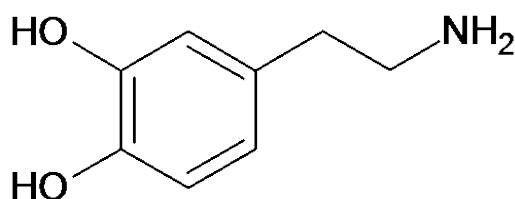
Outra característica importante é que, após saturar toda interface ar/água, a adição de mais tensoativos faz com que estas moléculas comecem a entrar em solução formando micelas. A concentração em que o surfactante começa a formar micelas é chamada de concentração micelar crítica (cmc). A cmc depende tanto do efeito hidrofóbico da “cauda” quanto do efeito hidrofílico da “cabeça”. Considerando surfactantes com a mesma “cabeça” o diferencial entre as cmc será proveniente dos tamanhos das “caudas” dos mesmos, quanto maior o efeito hidrofílico menor será a cmc.<sup>15</sup>

Por estas características o surfactante se mostrou um modificador importante neste trabalho. Aumentando a sensibilidade do biossensor pelo mecanismo de adsorção do analito, pois diminui a tensão superficial do sensor com a solução de dopamina.

## 2.4. Dopamina

A dopamina [2-(3,4-dihidroxifenil)etilamina], Figura 2, é um importante neurotransmissor do corpo humano e tem papel fundamental no funcionamento do sistema nervoso central, renal e hormonal. Sua determinação é de grande importância, tanto em fármacos como em fluídos biológicos, pelo fato de seu metabolismo anormal estar associado a doenças nervosas como, por exemplo, a epilepsia, a demência senil, o mal de Parkinson, a esquizofrenia e o mal de Alzheimer. O tratamento dessas doenças e transtornos muitas vezes passa pelo uso de medicamentos que contem em sua composição a dopamina.<sup>16,17</sup> A dopamina encontra-se disponível em medicamentos por via intravenosa e atua no sistema nervoso simpático produzindo efeitos como o aumento dos batimentos cardíacos e da pressão sanguínea.<sup>18,19</sup>

**Figura 2.** Estrutura molecular da dopamina.



## 2.5. Voltametria

Voltametria é uma técnica que estuda a relação entre o potencial, a corrente e o tempo durante a eletrólise em uma célula eletroquímica. É baseada na variação de potencial e medida da corrente gerada pela oxidação/redução de compostos em solução. Ela é realizada em uma cela eletroquímica com um sistema de três eletrodos: um eletrodo de referência, um de trabalho e um contra eletrodo, também chamado de eletrodo auxiliar.<sup>20,21</sup>

O potencial, por não ser uma grandeza absoluta, é medido em relação ao eletrodo de referência que apresenta um potencial padrão que não muda durante a medida. Um potencial variável com o tempo é aplicado ao eletrodo de trabalho gerando uma diferença de potencial em relação ao eletrodo de

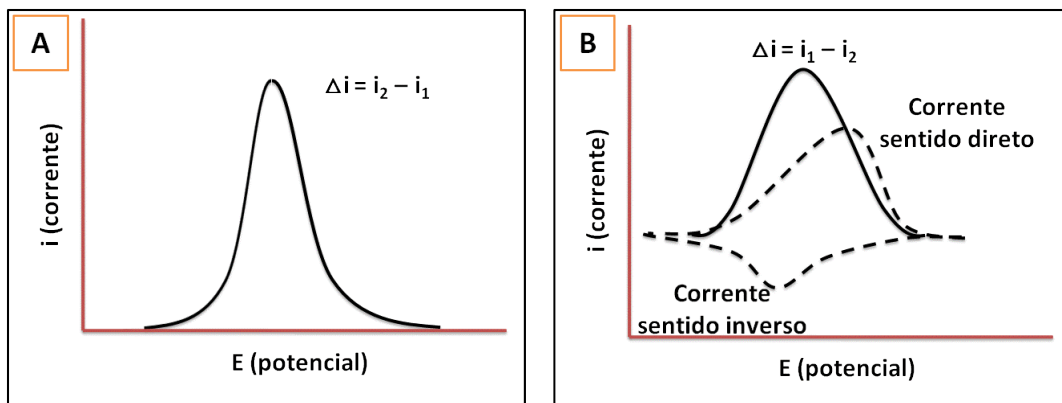
referência. Esta diferença de potencial aplicada promove a oxidação/redução de espécies presentes na cela eletroquímica e estes processos geram um fluxo de corrente que é medida entre os eletrodos de trabalho e o contra eletrodo. Esta corrente não flui através do eletrodo de referência, pois acarretaria na eletrólise da solução interna alterando o potencial do mesmo e assim perdendo a sua função.<sup>20,21</sup>

Existem diferentes tipos de técnicas voltamétricas: voltametria linear (VL), voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ), entre outras. As técnicas podem ser separadas em dois grandes grupos, voltametrias lineares e voltametrias pulsadas. As voltametrias lineares recebem este nome pelo fato de variarem o potencial linearmente em função do tempo. Já as voltametrias pulsadas, variam o potencial na forma de pulsos e a corrente é medida ao final de cada pulso. Por este motivo as técnicas pulsadas minimizam a corrente capacitiva, indesejada.<sup>20, 21</sup>

A corrente capacitiva esta associada ao carregamento da dupla camada elétrica formada pela diferença de potencial gerada através da superfície do eletrodo e os eletrólitos em solução, ou seja, não está associada diretamente a concentração do analito em solução. Já a corrente faradaica é proveniente apenas dos processos redox presente na solução e assim pode ser estabelecida uma relação entre a corrente faradaica e a concentração do analito em solução.

A principal diferença entre a VPD e a VOQ é que a VPD é uma técnica que ocorre em um único sentido, oxidação ou redução (Figura 3-A). Já a VOQ tem simultaneamente ciclos de oxidação e redução. A maior vantagem de utilizar a voltametria de onda quadrada em relação a pulso diferencial esta na sobreposição das correntes de redução e de oxidação, para processos reversíveis, como mostra a Figura 3-B.<sup>20, 21</sup>

**Figura 3.** Voltamogramas representativos das técnicas de pulso diferencial (A); E de onda quadrada para um processo reversível (B).



### **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor contendo lacase imobilizada em HNT e surfactante para determinação de dopamina usando a técnica de voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Extrair a enzima lacase de microesferas;
- Imobilizar a enzima lacase nos nanotubos de haloisita;
- Determinar a atividade enzimática por espectrometria de UV-Vis;
- Determinar o melhor surfactante (ImS3-10, ImS3-12, ImS3-14 e ImS3-16) para modificação do biossensor;
- Otimizar a concentração (unidades/mL) de lacase e a concentração do surfactante a ser adicionada no biossensor;
- Desenvolver um biossensor contendo lacase imobilizada em HNT e surfactante adicionado ao EPC;
- Investigar a influência da natureza e do pH do eletrólito de suporte na determinação voltamétrica da dopamina;
- Otimizar os parâmetros das técnicas de voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada;
- Investigar os possíveis compostos interferentes para a determinação de dopamina;
- Realizar estudos de reprodutibilidade e repetibilidade;
- Determinar dopamina em amostras farmacêuticas e comparar os resultados com o método de referência.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Reagentes e soluções

Os reagentes que foram utilizados neste trabalho são de grau analítico e por este motivo não passaram por processos de purificação. As soluções que foram utilizadas durante o trabalho foram preparadas com água deionizada para evitar erros por possíveis contaminantes.

As soluções tampão fosfato foram preparadas por meio da adição de sais de fosfato (dihidrogenofosfato e monohidrogenofosfato - Vetec) na proporção de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de cada e as soluções tiveram seu pH ajustado com uma solução de ácido fosfórico (Nuclear) ou com uma solução de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) dependendo do pH desejado.

As soluções tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas a partir da adição acetato de sódio e ácido acético  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich). O pH dessas soluções foram ajustados utilizando-se solução de ácido acético concentrado e hidróxido de sódio dependendo do pH desejado.

A solução de dopamina foi obtida a partir de 7,65 mg de dopamina (Sigma-Aldrich) e diluída com água deionizada avolumado até 10 mL afim de se atingir a concentração desejada.

A lacase (*Aspergillus oryzae*) foi obtida comercialmente da Novozyme encapsulada em microesferas. Essas foram maceradas, sendo a enzima extraída em tampão acetato (pH 5,0) e o extrato armazenado a  $4^\circ\text{C}$ . Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ABTS  $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich) e a solução de lacase.

O biossensor desenvolvido foi à base de pasta de carbono onde o pó de grafite foi obtido da Fisher Scientific e o nujol da Aldrich.

### 4.2. Equipamentos

A medida da atividade da enzima lacase foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis (Micronal, modelo B-572) utilizando uma cubeta de

quartzo com um caminho óptico de 1 cm. Para as medidas de pH das soluções tampão foi utilizado um pHmetro (Micronal, modelo B-475) contendo um eletrodo de vidro combinado.

Para as medidas voltamétricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato da Autolab PGSTAT 128N associado a um computador contendo um software de processamento de dados, NOVA versão 1.10. Foi utilizado uma cela eletroquímica de vidro de 15 mL com um sistema de três eletrodos: eletrodo de referência (Ag/AgCl saturado), eletrodo auxiliar (placa de platina, 0,5 cm<sup>2</sup>) e o eletrodo de trabalho (biossensor proposto). As medidas voltamétricas foram realizadas à temperatura ambiente.

#### **4.3. Determinação da atividade da lacase e imobilização em HNT**

A atividade enzimática foi determinada acompanhando a oxidação do substrato ABTS pela lacase em um espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 420 nm.<sup>22</sup> Para a medida do branco foi utilizado 2,8 mL de ABTS e 0,2 mL de água deionizada em uma cubeta de quartzo. A atividade foi medida a partir da adição de 0,2 mL da solução de lacase e 2,8 mL de ABTS. A oxidação do ABTS foi acompanhada com o tempo anotando-se a cada 10 segundos o valor da absorvância. Este estudo foi realizado em triplicata durante um tempo total de 3 minutos e então construído o gráfico da absorvância vs tempo (min) e a atividade da enzima lacase calculada em unidades por mL (U mL<sup>-1</sup>). Após determinação da atividade, a enzima foi imobilizada em haloisita (Sigma-Aldrich), via adsorção física. Este procedimento foi feito através da adição de 10 µL de lacase com concentração de 0,05 U mL<sup>-1</sup> em 20 mg de HNT. Esta mistura foi homogeneizada e seca, a vácuo, durante 1 hora.

#### **4.4. Construção do biossensor**

Para construção do biossensor foram adicionados 10 µL de lacase (0,05 U mL<sup>-1</sup>) em 20 mg de HNT. ImS3-14 (2 mg) foi preparada em uma mistura de



nujol e clorofórmio e usada como aglutinante. O biossensor foi obtido após maceração dos componentes na proporção: 70:20:10% (m/m/m) grafite:aglutinante: HNT-lacase, que formou uma pasta e foi compactada em uma seringa e um fio de cobre foi usado como contato elétrico. Após a construção, o biossensor foi deixado em repouso para evaporação do clorofórmio evitando o aumento da capacitância do eletrodo.

#### **4.5. Escolha do melhor surfactante**

Os surfactantes, 3-(1-decil-3-imidazólio) propanosulfonato (ImS3-10), 3-(1-dodecil-3-imidazólio) propanosulfonato (ImS3-12), 3-(1-tetradecil-3-imidazólio) propanosulfonato (ImS3-14) e 3-(1-hexadecil-3-imidazólio) propanosulfonato (ImS3-16), usados na construção dos biossensores, foram sintetizados e caracterizados pelo Laboratório de Catálise de Fenômenos Interfaciais (LACFI/INCT-catálise) e cedidos, na forma de colaboração, ao Laboratório de Biossensores (LaBios). Os surfactantes foram avaliados através do estudo de impedância. Para isso, foram construídos 4 sensores (EPC), cada qual contendo um dos 4 surfactantes, citados acima. O sensor contendo o surfactante que apresentou a menor resistência a passagem de corrente e a menor capacitância foi utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

#### **4.6. Preparo das amostras e determinação de dopamina**

A amostra, contendo dopamina, foi obtida comercialmente e armazenada a baixa temperatura para evitar sua degradação. Para análise a amostra foi diluída a uma concentração adequada para o estudo (próxima da solução padrão de dopamina).

O teor de dopamina na amostra foi determinado empregando o método de adição de padrão utilizando o biossensor proposto e as técnicas de voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial, com o eletrólito de suporte no pH onde foi obtido as maiores respostas para dopamina

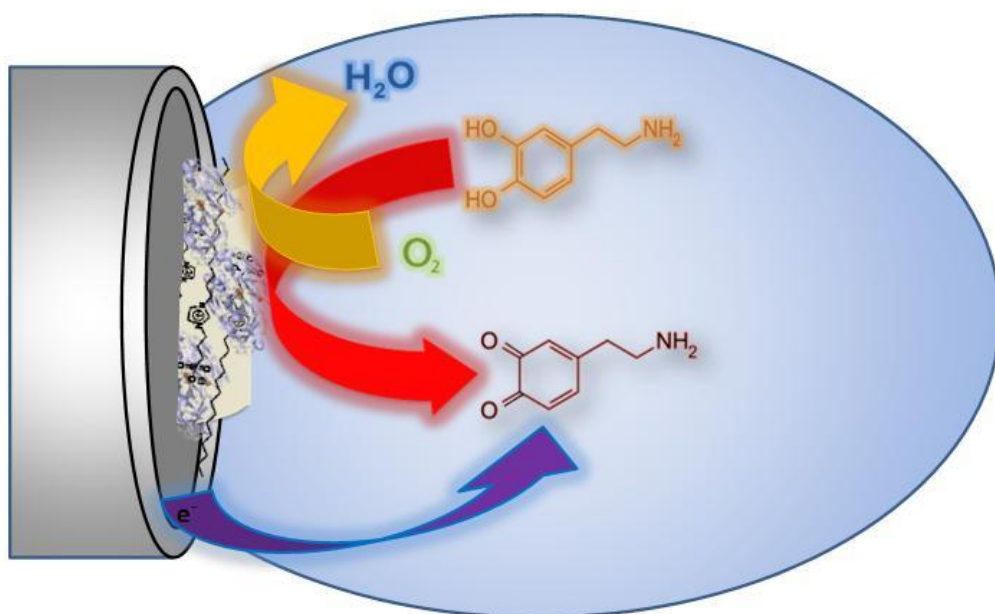
(tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7). Comparativamente foi utilizado o método padrão descrito pela Farmacopeia Americana (espectrofotometria).<sup>23</sup>

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Princípio de funcionamento do biossensor

A Figura 4 mostra uma representação esquemática do EPC modificado com ImS3-14 e enzima lacase imobilizada em HNT. Inicialmente, a dopamina é oxidada a o-quinona na superfície do biossensor com a concomitante redução do oxigênio molecular a água. Após este processo, elétrons são gerados na superfície do biossensor, devido à aplicação do potencial, fazendo com que a o-quinona retorne a sua forma reduzida. Desta forma, a corrente resultante do processo no sentido da oxidação e redução da dopamina catalisada pela enzima é medida. O oxigênio envolvido na reação enzimática é o dissolvido na água, desta maneira não há necessidade de controlar a concentração necessária para o funcionamento da enzima, pois a solubilidade do oxigênio na água é alta e a quantidade utilizada pela enzima é pequena, portanto deixando o sistema aberto sempre haverá oxigênio suficiente para que a reação ocorra.

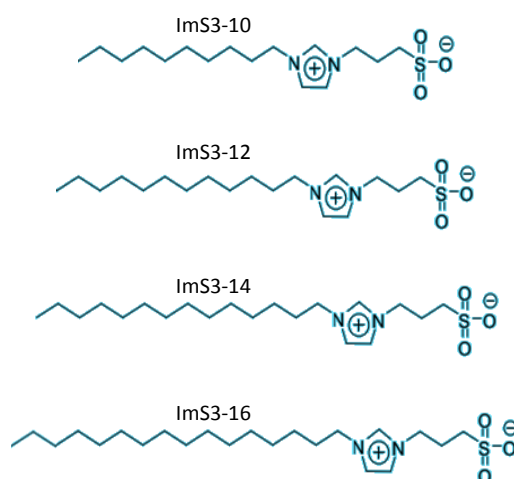
**Figura 4.** Princípio do funcionamento do biossensor contendo a enzima lacase imobilizada em HNT e o surfactante ImS3-14 empregado na determinação da dopamina.



## 5.2. Escolha do surfactante

Os surfactantes (Figura 5) utilizados na realização desse trabalho apresentam a mesma estrutura com a diferença apenas do tamanho da cadeia hidrofóbica (10, 12, 14 e 16 carbonos). Foram construídos quatro eletrodos contendo os surfactantes ImS3-10, ImS3-12, ImS3-14 e ImS3-16, e testados usando a espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados são apresentados na Figura 6-A, a partir do qual se pode obter duas principais informações, a resistividade, medida pela altura do semicírculo, (Figura 6-B) e a capacitância, medida pelo tamanho da parte linear do gráfico, (Figura 6-C) destes eletrodos.

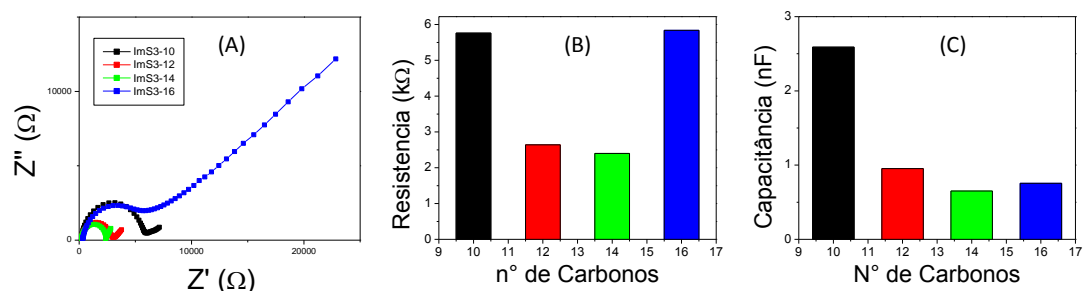
**Figura 5.** Estrutura dos surfactantes estudados por espectroscopia de impedância eletroquímica.



Analisando-se os gráficos (Figura 6) pode-se observar que o eletrodo que obteve a menor capacitância e a menor resistividade a passagem de corrente foi o que continha o surfactante ImS3-14, portanto, **esse** foi o surfactante utilizado para o desenvolvimento desse trabalho. Este resultado pode estar associado com o aumento do número de carbonos da cauda do surfactante, ou seja, há um aumento da hidrofobicidade do surfactante, e desta forma um aumento na resistividade do mesmo. Já quando há a diminuição do número de carbonos da cadeia hidrofóbica diminui a propriedade tensoativa e desta forma há uma perda da organização do surfactante na pasta de carbono dificultando a conexão dos componentes do eletrodo e assim dificultando a

passagem de corrente gerando um aumento da resistividade e da capacitância do eletrodo.

**Figura 6.** Gráficos do estudo da espectroscopia de impedância eletroquímica para os eletrodos contendo os surfactantes: ImS3-10, ImS3-12, ImS3-14 e ImS3-16.



### 5.3. Estudo da quantidade de enzima empregada no biossensor

Foram investigadas diferentes quantidades de enzima, expressa em unidades por mL ( $\text{U mL}^{-1}$ ), empregadas na construção do biossensor. As concentrações usadas foram na faixa de 0,01 a 5,0  $\text{U mL}^{-1}$ , sendo a maior resposta do biossensor encontrada na concentração de 0,05  $\text{U mL}^{-1}$  de lacase. Isto pode está associado ao fato de que em concentrações menores, há pouca enzima distribuída na superfície do biossensor o que resulta em uma menor quantidade de dopamina que pode ser oxidada cataliticamente pela enzima e assim uma menor corrente resultante do processo é gerada. Enquanto isso, em concentrações maiores existe um recobrimento muito grande da superfície do biossensor dificultando a passagem de corrente proveniente do processo de oxirredução da dopamina, assim existe muita enzima para catalisar o processo, mas falta contato para o transporte de elétrons.<sup>24,25</sup>

Desta maneira é necessária uma quantidade de enzima ótima possibilitando uma catálise eficiente no processo de oxirredução da dopamina, mas com o recobrimento adequado da superfície do biossensor. Pode-se dizer então que a concentração de 0,05  $\text{U mL}^{-1}$  foi a quantidade ideal de lacase para ser utilizada no biossensor proposto.

#### 5.4. Influência dos modificadores no biossensor

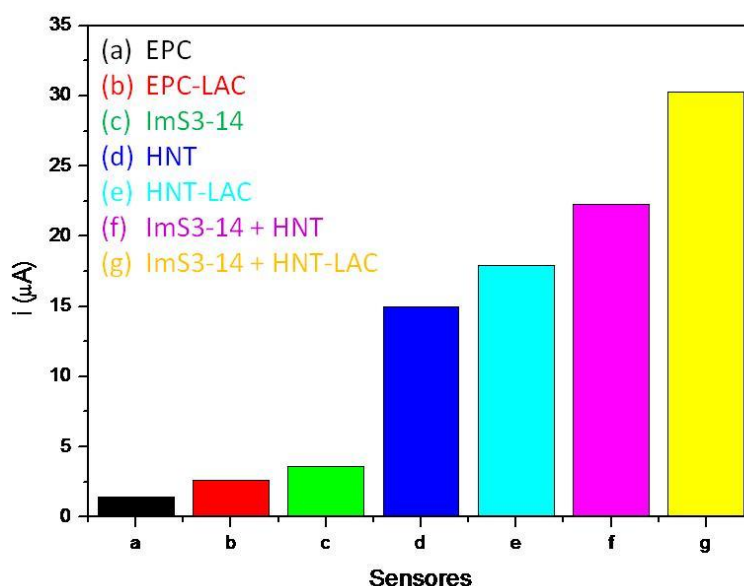
A fim de se avaliar a influência de cada componente modificador do biossensor proposto, estes foram investigados separadamente e em diferentes combinações. Foram construídos sete sensores: **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** e **g**, testados para a detecção de dopamina e a resposta encontra-se na Figura 7. Primeiro, temos em “**a**” a contribuição apenas do EPC que apresentou uma resposta baixa comparada aos outros sensores testados. Em “**b**” há um aumento da resposta próximo a 1,84 vezes, em relação ao eletrodo “**a**”, ao utilizarmos a lacase (sem o processo de imobilização), pois esta catalisa o processo de oxidação da dopamina. Já na letra “**c**” observamos a contribuição do surfactante para o aumento da corrente resultante do processo de oxirredução da dopamina, apresentando um aumento de aproximadamente 2,49 vezes em relação a resposta observada em “**a**”, devido à facilitação da chegada do analito a superfície do sensor e também no auxílio ao transporte de elétrons. Em “**d**” há a contribuição da HNT que foi ainda maior que a dos outros modificadores chegando a um aumento de 10,47 vezes em relação à resposta do EPC sem modificação (letra “**a**”), pois este é um material de elevada porosidade e assim consegue adsorver parte do analito.

Após a análise da contribuição dos modificadores individualmente, foram feitos testes de misturas destes para avaliar a contribuição da resposta eletroquímica e eficiência do sistema. Os resultados são em “**e**” a lacase imobilizada em HNT que apresentou um aumento de aproximadamente 12,54 vezes em relação a resposta observada em “**a**” devido ao fato de agora além da porosidade do nanomaterial existe a contribuição da catálise da enzima. Em “**f**” há a mistura de HNT e ImS3-14 que apresentou um aumento de 15,55 vezes porque provavelmente com a adição do surfactante houve a facilitação da aproximação das moléculas de dopamina a superfície do sensor, além do auxílio ao transporte de elétrons, devido a sua carga e a interação do surfactante e as folhas de grafite. E por fim temos “**g**” como o biossensor proposto onde temos a lacase imobilizada em HNT e também o ImS3-14 que foi o que apresentou o maior aumento dos sensores testados chegando a 21,15 vezes, aproximadamente, em relação a resposta do EPC sem

modificação (eletrodo “a”), isto devido a atuação em conjunto dos três modificadores propostos.

Pode-se observar que a adição de cada modificador separadamente aumentou a resposta do biossensor para dopamina. Também é possível observar que a adição simultânea dos modificadores em um único sensor mostrou que os mesmos atuaram em sinergismo resultando em uma resposta maior de corrente para os processos de oxidação e redução da dopamina (Figura 7. sensor “g”). Desta maneira foi o biossensor escolhido para o desenvolvimento dos estudos posteriores devido a sua comprovada eficiência comparada aos demais sensores testados.

**Figura 7.** Gráfico do estudo da influência dos modificadores sobre a resposta do sensor para dopamina.



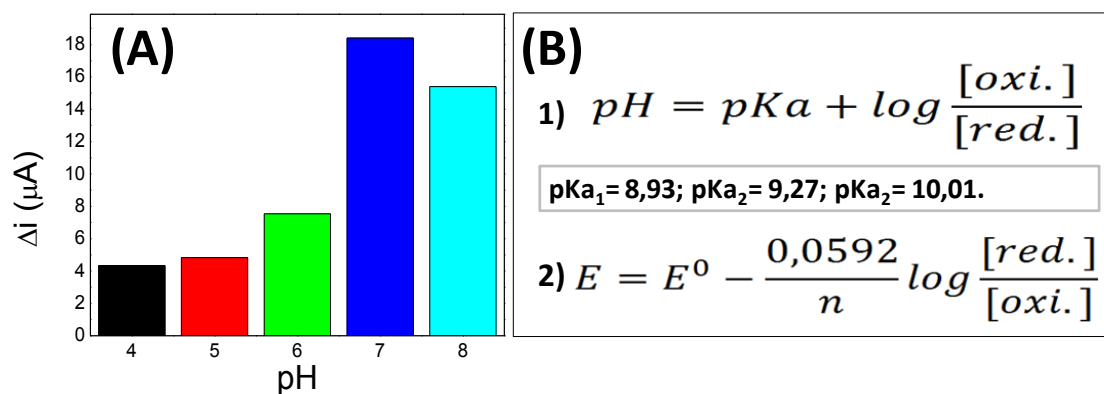
### 5.5. Otimização do pH e da natureza do eletrólito de suporte

Foram investigados o pH e a natureza do eletrólito de suporte (Figura 8-A), para isso foram feitas diversas soluções tampões de acetato e de fosfato em diferentes pH. Foram investigadas soluções de acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em uma faixa de pH de 4 a 5 e soluções de fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em uma faixa de pH de 6 a 8. O pH onde foi obtida a maior resposta eletroquímica para dopamina foi em tampão fosfato pH 7,0.

Quanto maior o pH da solução maior o número de moléculas de dopamina estarão se convertendo de uma forma para outra (reduzida/oxidada), pois quanto mais próximo do pKa o pH estiver, mais próximo de um estado onde as concentrações sejam iguais (espécie reduzida e oxidada), favorecendo assim o equilíbrio e facilitando o controle do processo de oxirredução da dopamina. Desta maneira ao ser aplicada o programa de potencial uma maior quantidade de analito estará sujeita a oxidar/reduzir. Isto pode ser observado pela Figura 8-B que traz as equações de equilíbrio (1) e de Nernst (2), representando o que foi discutido.

Apesar disso, em pH 8 houve uma diminuição da resposta para dopamina (Figura 8-A), isto pode estar associado ao fato da utilização de uma enzima (lacase pH ideal de 5 a 7)<sup>26</sup> no sensor, desta forma se a lacase for submetida a uma solução de pH muito elevado esta pode perder a sua conformação e assim perder a sua atividade catalítica. Por isso, que em pH maior que 7 foram obtidos resultados menores, mesmo favorecendo o equilíbrio das espécies de dopamina. Por este motivo, solução tampão fosfato pH 7,0 (0,1 mol L<sup>-1</sup>), foi o escolhido para continuar o trabalho.

**Figura 8.** (A) Estudo do pH da natureza do eletrólito de suporte. (B) 1) Equação de equilíbrio de oxirredução da dopamina; 2) Equação de Nernst.



## 5.6. Otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas

Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas voltamétricas, voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD). Para o melhor desempenho em cada uma, foram investigados os parâmetros de cada técnica e os resultados estão representados na Tabela 1. Comparando os parâmetros das duas técnicas estudadas observa-se que um dos principais motivos da maior resposta para dopamina utilizando a VOQ é o fato desta técnica ser mais rápida. Dessa forma ocorre a oxidação e a redução da dopamina em um intervalo mais curto de tempo favorecendo o aumento da corrente de pico resultante dos processos de oxidação e redução da dopamina.<sup>20,21</sup> Outro motivo é o de que a VOQ ocorre nos dois sentidos, oxidação e redução, sobrepondo as correntes de pico e assim gerando um aumento da corrente resultante quando o processo oxirredutivo é reversível ou parcialmente reversível.

**Tabela 1:** Parâmetros das técnicas de VPD e VOQ.

| Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)        |           |      | Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)            |           |      |
|-----------------------------------------------|-----------|------|-----------------------------------------------|-----------|------|
| Parametro                                     | Faixa     | M.R. | Parametro                                     | Faixa     | M.R. |
| Incremento de Potencial (mV)                  | 0,5 – 5   | 2,5  | Incremento de Potencial (mV)                  | 1 – 10    | 5    |
| Intervalo de Pulso (s)                        | 0,3 - 0,8 | 0,4  | Frequência (Hz)                               | 10 – 100  | 100  |
| Velocidade de Varredura (mV s <sup>-1</sup> ) | 1 – 10    | 6,25 | Velocidade de Varredura (mV s <sup>-1</sup> ) | 50 – 1000 | 500  |
| Amplitude de Pulso (mV)                       | 25 – 100  | 50   | Amplitude de Pulso (mV)                       | 10 – 100  | 50   |

M.R. = melhor resposta.

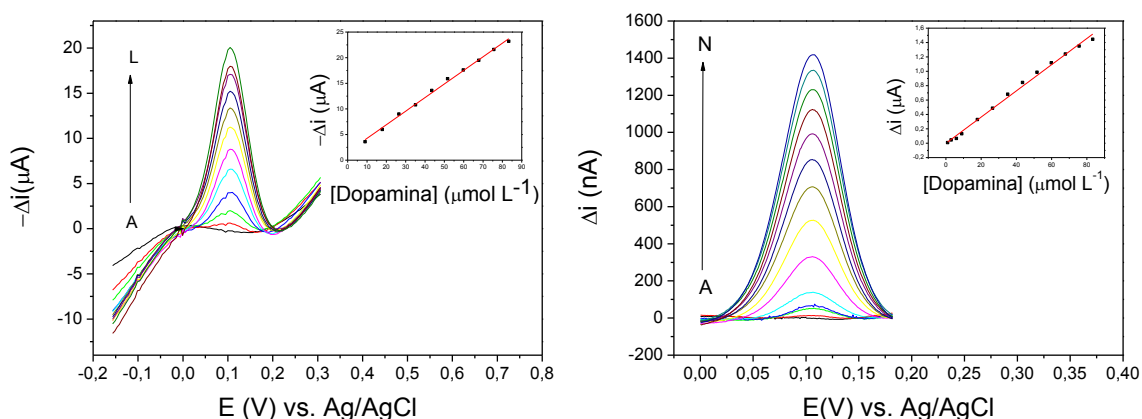
## 5.7. Curva de calibração para dopamina

Após a otimização dos parâmetros instrumentais e das técnicas voltamétricas foram obtidas as curvas de calibração tanto para VOQ quanto para VPD. As duas curvas estão representadas na Figura 9. Como pode-se observar a curva utilizando VOQ se mostrou mais sensível que a curva utilizando VPD, isto pode ser analisado pela inclinação da reta, ou seja, pelo coeficiente angular de cada curva. Os parâmetros da reta para VOQ foram:  $i = 1,60504(\pm 0,27810) + 0,26531(\pm 5,28 \times 10^{-3})[DOP]$  com um  $r$  de 0,996. Para VPD



temos:  $i = -0,00144(\pm 0,01776) + 0,01823(\pm 3,84 \times 10^{-4})[DOP]$  com um  $r$  de 0,995. Os limites de detecção e quantificação calculados a partir das curvas foram de  $3,14 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $10,48 \mu\text{mol L}^{-1}$  para VOQ e de  $2,92 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $5,90 \mu\text{mol L}^{-1}$  para VPD, respectivamente.

**Figura 9.** Voltamogramas de VOQ e VPD para dopamina em solução tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 7,0 com a inserção das curvas de calibração.

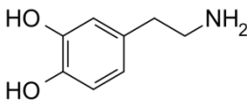
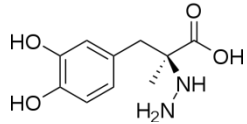
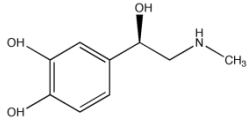
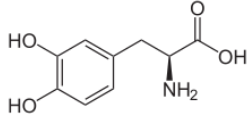
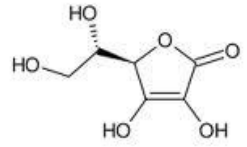
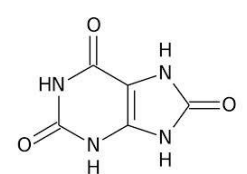


## 5.8. Estudo de Interferentes

Para testar o biossensor para o reconhecimento da dopamina foi realizado um estudo de interferentes, onde foram feitas determinações de diferentes compostos fenólicos, ácido úrico e ácido ascórbico utilizando o sensor proposto. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 2. Considerando a resposta para dopamina como 100% pode-se observar que as porcentagens para as correntes dos outros compostos analisados foram baixas e nenhum se aproximou da resposta para dopamina, ou seja, nenhum dos compostos obteve uma resposta comparável a da dopamina.

Apesar de este estudo indicar que nenhum destes compostos é um potencial interferente, não foram analisados em uma mesma solução (dopamina e interferente), e não pode-se comprovar que não houve interferência. Para ser utilizado para determinação em fluídos biológicos seria necessário um novo estudo de interferentes avaliando-se dopamina e interferente em uma mesma solução.

**Tabela 2.** Possíveis interferentes para a detecção de dopamina.

| Composto        | Estrutura                                                                           | E(V)  | % Resposta <sup>a</sup> |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------|
| Dopamina        |    | 0,16  | 100                     |
| Carbidopa       |    | 0,14  | 6,93                    |
| Adrenalina      |    | 0,19  | 6,48                    |
| L-DOPA          |    | 0,04  | 2,74                    |
| Ácido Ascorbico |   | -0,41 | 0,72                    |
| Ácido Úrico     |  | -0,01 | 0,084                   |

<sup>a</sup> Resposta dos compostos utilizando a resposta para dopamina como 100%

### 5.9. Estudo de Recuperação

O estudo foi feito através de medidas eletroquímicas (VOQ e VPD) utilizando o biossensor proposto para determinar concentrações conhecidas de dopamina. Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 3. E como se pode observar, o estudo da recuperação comprova a eficiência do biossensor. Adicionalmente, a técnica de VPD foi mais precisa nas medidas que a VOQ.

**Tabela 3:** Estudo de recuperação de dopamina usando a VOQ e VPD

| Amostra |                        | Dopamina (molL <sup>-1</sup> ) |              |
|---------|------------------------|--------------------------------|--------------|
| VOQ     | [Adicionado]*          | [Recuperado]*                  | % Recuperada |
| A       | 1,92 x10 <sup>-5</sup> | 2,09 x10 <sup>-5</sup>         | 108,7        |
|         | 3,77 x10 <sup>-5</sup> | 3,90 x10 <sup>-5</sup>         | 103,4        |
|         | 5,56 x10 <sup>-5</sup> | 5,42 x10 <sup>-5</sup>         | 97,6         |
| B       | 1,92 x10 <sup>-5</sup> | 2,14 x10 <sup>-5</sup>         | 111,4        |
|         | 3,77 x10 <sup>-5</sup> | 3,85 x10 <sup>-5</sup>         | 102,0        |
|         | 5,56 x10 <sup>-5</sup> | 5,43 x10 <sup>-5</sup>         | 97,8         |
| VPD     | [Adicionado]*          | [Recuperado]*                  | % Recuperada |
| A       | 1,92 x10 <sup>-5</sup> | 1,96 x10 <sup>-5</sup>         | 101,9        |
|         | 3,77 x10 <sup>-5</sup> | 3,76 x10 <sup>-5</sup>         | 99,6         |
|         | 5,56 x10 <sup>-5</sup> | 5,56 x10 <sup>-5</sup>         | 100,0        |
| B       | 1,92 x10 <sup>-5</sup> | 1,94 x10 <sup>-5</sup>         | 101,0        |
|         | 3,77 x10 <sup>-5</sup> | 3,63 x10 <sup>-5</sup>         | 96,1         |
|         | 5,56 x10 <sup>-5</sup> | 5,58 x10 <sup>-5</sup>         | 100,5        |

\*Solução padrão de dopamina (mol L<sup>-1</sup>) adicionada a cela eletroquímica

### 5.10. Estudo de reprodutibilidade e repetibilidade

Os estudos foram realizados em um mesmo laboratório, desta maneira pode-se dizer que os testes feitos foram de reprodutibilidade entre biossensores e de precisão entre medidas. Como resultados para precisão do método foram obtidos desvios relativos de 5,6% para VOQ e de 8,5% para VPD. Este resultado é referente a dez medidas utilizado-se o mesmo biossensor. Já para o estudo de reprodutibilidade foram confeccionados quatro eletrodos construídos sob a mesma metodologia, e como resultados obtiveram-se desvios relativos de 7,0% para VOQ e de 8,1% para VPD.

Como podem ser observados, os biossensores apresentaram uma boa reprodutibilidade e o método mostrou boa precisão, considerando-se ainda que o biossensor proposto apresente certa complexidade devido à adição dos três modificadores.

### 5.11. Determinação de dopamina em fármaco

Após as otimizações o biossensor foi testado para determinação da dopamina. Esta determinação foi feita em uma amostra farmacêutica contendo dopamina. A amostra foi escolhida devido a sua simplicidade se comparada a

uma amostra biológica, por exemplo, que apresenta muitos outros componentes além do analito de interesse. Para esta análise foram utilizadas duas ampolas contendo o analito em concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , valor rotulado das amostras. A determinação foi feita utilizando o biossensor proposto e as técnicas de VOQ e VPD em comparação ao método espectrofotométrico que é o método oficial descrito pela Farmacopéia Americana para determinação de dopamina. Os resultados destas determinações são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Determinação de dopamina em amostras farmacêuticas.

| Dopamina – Amostra farmacêutica ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |          |                            |                 |                 |                   |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------|----------|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra                                                 | Rotulado | Método Padrão <sup>1</sup> | VOQ             | VPD             | Erro (%)          |                   |                   |                   |
| A                                                       | 5        | $5,47 \pm 0,01$            | $5,44 \pm 0,44$ | $5,10 \pm 0,37$ | 0,55 <sub>a</sub> | 6,76 <sub>b</sub> | 8,80 <sub>c</sub> | 2,00 <sub>d</sub> |
| B                                                       | 5        | $5,61 \pm 0,01$            | $5,19 \pm 0,33$ | $5,13 \pm 0,02$ | 7,49 <sub>a</sub> | 8,56 <sub>b</sub> | 3,80 <sub>c</sub> | 2,60 <sub>d</sub> |

<sup>a</sup> Erro relativo - VOQ vs. método referência

<sup>b</sup> Erro relativo - VPD vs. método referência

<sup>c</sup> Erro relativo - VOQ vs. Rotulado

<sup>d</sup> Erro relativo - VPD vs. Rotulado

Como se pode observar, os resultados utilizando o biossensor proposto mostraram-se satisfatórios, e próximos dos valores rotulados e dos valores obtidos pelo método oficial.

O estudo foi feito através de uma curva de calibração por adição de padrão, e para analisar a possibilidade deste biossensor ser utilizado em controle de qualidade de medicamentos, as curvas de calibração por adição de padrão e de padrão externo devem ser paralelas. Isso indicaria que a matriz da amostra não interferiu no resultado e então pode-se utilizar a curva de calibração por padrão externo para obter um resultado da concentração de dopamina a partir da corrente medida na amostra. Para que as curvas sejam paralelas, é necessário que os coeficientes angulares sejam iguais.

O coeficiente angular para a amostra A foi de 0,2174 para VOQ e de 0,05394 para VPD enquanto que para a amostra B foi de 0,18818 para VOQ e de 0,05125 para VPD, sendo que os coeficientes angulares das curvas de calibração por padrão externo foram de 0,26531 para VOQ e de 0,01823 para VPD. Desta maneira podemos observar que embora a matriz da amostra seja

muito simples ela afetou muito mais a técnica de VPD do que a de VOQ. Já os coeficientes angulares foram próximos para VOQ, pela calibração de adição padrão e pela calibração de padrão externo. Indicando uma menor influência da matriz da amostra sobre o biossensor quando utilizamos a técnica de VOQ.

## 6. CONCLUSÃO

Os estudos mostraram o aumento individual na resposta que cada modificador proporcionou quando adicionado ao EPC e também que esses modificadores, quando associados ao mesmo sensor, atuaram em sinergismo contribuindo para um grande aumento da resposta, em corrente, do processo oxirredutivo envolvendo o analito. Além dos modificadores, a otimização das condições experimentais e instrumentais propiciaram uma melhora analítica, aumentando ainda mais a sensibilidade do método.

Os estudos ainda comprovaram que o biossensor foi eficiente na determinação de dopamina presente em amostras farmacêuticas. Assim, o mesmo poderia ser eficiente na utilização como controlador de qualidade de medicamentos que contenham dopamina. Tanto a reprodutibilidade quanto à precisão do método apresentaram resultados promissores e com isso pode-se observar o potencial que o biossensor apresenta para ser empregado.

Como perspectivas para este trabalho podemos avaliar a utilização do biossensor em outros tipos de amostras como, por exemplo, em amostras biológicas, mesmo estas apresentando uma matriz mais complexa devido à seletividade apresentada pelo biossensor. Também poderia ser estudada a sua aplicação para determinação de dopamina em efluentes urbanos e industriais.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Franzoi, A.C.; Brondani, D.; Zapp, E.; Moccelini, S.K.; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C. **Quim. Nova.**, 34, 1042-1050, 2011.
2. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.. **Quim. Nova.**, 25, 1012-1021, 2002..
3. Kirsch, J.; Siltanen, C.; Zhou, Q.; Revzin, A.; Simonian, A.. **Chem. Soc. Rev.**, 42, 8733-8768, 2013.
4. Tashkhourian, J.; Nami-Ana, S.F. **Mat. Sci. Eng. C.**, 52, 103-110, 2015.
5. Consorti, C.S.; Souza, R.F.; Dupont, J.; Suarez, P.A.Z. **Quim. Nova.**, 24, 830-837, 2001.
6. Dominguez, A.; Rodríguez, O.; Tavares, A.P.M.; Macedo, E.A.; Longo, M.A.; Sanromán, M.Á.. **Bioresour. Technol.**, 102, 7494-7499, 2011.
7. Vianello, F.; Ragusa, S.; Cambria, M.T.; Rigo, A. **Biosens. Bioelectron.**, 21, 2155-2160, 2006.
8. Durán, N.; Rosa, M. A.; D'annibale, A.; Gianfreda, L.. **Enzyme Microb. Technol.**, 31, 907-931, 2002.
9. Woo, E.; Kwon, H.; Lee, C. **Chem. Eng. J.**, 274, 1-8, 2015.
10. Cristóvão, R. O.; Tavares, A.P.M.; Brígida, A. I.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. A. R.; Macedo, E. A.; Coelho, M. A. Z. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 72, 6-12, 2011.
11. Pagán, M.; Suazo, D.; del Toro, N.; Griebenow, K. **Biosens. Bioelectron.**, 64, 138-146, 2015.
12. Tavares, A. P. M.; Silva, C. G.; Drazic, G.; Silva, A. M. T.; Loureiro, J. M.; Faria, J. L. **J. Colloid. Interf. Sci.**, 454, 52-60, 2015.
13. Silva, M. F.; Pineda, E. A. G.; Bergamasco, R. **Quim. Nova**, 38, 393-398, 2015.
14. Attwood, D. **Surfactant Systems; Their Chemistry, Pharmacy and Biology**. 1 ed., Nova York: Chapman and Hall, 779p., 1983.

15. Elworthy, P. H. **Solubilization by surface-active agents and its applications in chemistry and the biological sciences.** 1 ed., Londres: Chapman and Hall, 335p., 1968.
16. Cao, X.; Luo, L.; Ding, Y.; Zou, X.; Bian, R. **Sens. Actuators, B.**, 129, 941-946, 2008.
17. Ikemoto, S.; Yang, C.; Tan, A. **Behav. Brain Res.**, 290, 17-31, 2015.
18. Huang, Q.; Zhang, H.; Hu, S.; Li, F.; Weng, W.; Chen, J.; Wang, Q.; He, Y.; Zhang, W.; Bao, X. **Biosens. Bioelectron.**, 52, 277-280, 2014.
19. Staden, J. F.; Staden R. S. **Talanta**, 102, 34-43, 2012.
20. Bard, A. J. **Métodos eletroquímicos: fundamentos e aplicações.** 2 ed., Nova York: John Wiley & Sons, INC., 833p., 2001.
21. Brett, C. M. A. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações.** 2 ed., Nova York: Oxford University Press Inc., 427p., 1994.
22. Sinirlioglu, Z. A.; Sinirlioglu, D.; Akbazi, F. **Bioresour. Technol.**, 146, 807-811, 2013.
23. **United States Pharmacopeia**, The Official Compendia of Standards, 2007, p. 1998.
24. Razola, S. S.; Ruiz, B. L.; Diez, N. M.; Mark Jr, H. B.; Kauffmann, J-M. **Biosens. Bioelectron.**, 17, 921-928, 2002.
25. Vieira, I. C.; Lupetti, K. O.; Fatibello-Filho, O. **Quim. Nova**, 26, 1, 2003.
26. Rodriguez-Delgado, M. M.; Alemán-Nava, G. S.; Rodriguez-Delgado, J. M.; Dieck-Assad, G.; Martínez-Chapa, S. O.; Barceló, D.; Parra, R. **Trend. Anal. Chem.**, 74, 21-45, 2015.